

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



549474

(43) 国際公開日
2004 年 9 月 30 日 (30.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/082704 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 38/17, 31/7088, 35/76, 48/00,
A61P 19/02, 19/08, 19/10, 29/00, 43/00

城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社
ディナベック研究所内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002887

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 5 日 (05.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-075964 2003 年 3 月 19 日 (19.03.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株
式会社ディナベック研究所 (DNAMEC RESEARCH
INC.) [JP/JP]; 〒3050856 茨城県つくば市観音台 1 丁
目 2 5 番 1 1 号 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 居石 克夫
(SUEISHI, Katsuo) [JP/JP]; 〒8150073 福岡県福岡市
南区大池 1-29-22 Fukuoka (JP). 米満 吉和
(YONEMITSU, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒8130043 福岡県
福岡市東区名島 5-31-3 Fukuoka (JP). 山下 彰
久 (YAMASHITA, Akihisa) [JP/JP]; 〒8112311 福岡県
糟屋郡粕屋町長者原 3 2 9 C 棟 2 0 2 Fukuoka (JP).
吉村 昭彦 (YOSHIMURA, Akihiko) [JP/JP]; 〒8300001
福岡県久留米市小森野 2-7-2 Fukuoka (JP). 長谷
川 護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒3050856 茨

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF TREATING INFLAMMATORY DISEASE ASSOCIATED WITH BONE DESTRUCTION

(54) 発明の名称: 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法

(57) Abstract: A method of treating an inflammatory disease associated with bone destruction which comprises the step of admin-
istering a virus vector having a gene inhibiting the signal transduction mediated by fibroblast growth factor 2 (FGF2)-FGF receptor
1-Ras-Raf-MAP kinase to the affected site. A composition for treating an inflammatory disease associated with bone destruction
which contains the above vector. By inhibiting the FGF2 signal transduction by topically administering the virus vector, inflam-
mation and bone destruction in inflammatory bone destruction can be successfully suppressed at the same time. Thus, a method of
specifically and effectively treating inflammatory bone diseases such as rheumatoid arthritis, which can be hardly treated hitherto,
and a composition for treating the same are provided.

(57) 要約: 本発明は、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2)-FGF 受容体 1-Ras-Raf-MAP キナーゼを介するシグナル伝達を
阻害する遺伝子を有するウイルスベクターを疾患部位に投与する工程を含む、骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法
に関する。また本発明は、該ベクターを含む、骨破壊を伴う炎症性疾患の治療組成物に関する。ウイルスベクター
の局所投与を介して FGF2 のシグナル伝達を阻害することにより、炎症性骨破壊における炎症と骨破壊の両方を同時
に抑制することに成功した。本発明は、これまで治療が困難であった関節リウマチ等の炎症性骨疾患に対する、疾
患特異的かつ効果的な治療方法、および治療組成物を提供する。

WO 2004/082704 A1

明細書

骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法

5 技術分野

本発明は、線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2: FGF2) の機能制御、及びその細胞内信号伝達系の遮断により骨破壊を伴う炎症性疾患を治療する方法に関する。本発明の方法は、特に関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の治療に有用である。

10

背景技術

これまでの世界的医学研究によりRAに対する種々の治療戦略および疾患修飾性抗リウマチ剤 (disease modifying anti-rheumatoid drugs: DMARDs) が開発されてきた。RA治療に関する従来の主要な技術 (RA治療戦略) を以下に列挙する。これらはRAに対する生物学的作用薬を用いた治療及びその治療戦略である。

15

① 腫瘍壊死因子 (tumor necrotic factor: TNF) 制御による治療法

可溶性TNF受容体 (Moreland, L.W. et al., N. Engl. J. Med. 337:141-147 (1997); Bathon, J.M. et al., N. Engl. J. Med. 343:1586-1593 (2000)) または抗TNF- α 抗体 (Maini, R.N. et al., Ann. Rheum. Dis. 58:I56-I60 (1999); Lipsky, P.E. et al., N. Engl. J. Med. 343:1594-1602 (2000); Maini, R.N. et al., Lancet 354:1932-1939 (1999)) を用いてTNF- α の機能制御によりRAを治療する抗サイトカイン療法である。

20

② インターロイキン-1 (interleukin-1: IL-1) 制御による治療法

IL-1レセプターアンタゴニストを用いてIL-1の機能制御によりRAを治療する抗サイトカイン療法である (Cohen, S. et al., Arthritis Rheum. 46:614-624 (2002))。

25

③ IL-6制御による治療法

抗IL-6受容体モノクローナル抗体を用いてIL-6の機能制御によりRAを治療する抗サイトカイン療法である (Nishimoto, N. et al., Ann. Rheum. Dis. 59:I21-I27 (2000))。

5 ④ VEGF機能制御による治療法

可溶性VEGF受容体 (Miotla, J. et al., Lab. Invest., 80:1195-205 (2000)) または抗VEGF抗体 (Lu, J. et al., J. Immunol. 164:5922-7 (2000); Sone, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 281:562-8 (2001)) を用いてVEGFの機能を阻害することによってRAを治療する抗サイトカイン療法である。

- 10 しかし、これらの従来技術には幾つか問題点が存在する。主要な問題点としては、例えば最終的に骨関節破壊を免れることは困難であることが挙げられる。すなわち、従来の治療法及び薬剤では滑膜炎抑制に基づく自他覚症状の緩和という面においては治療効果が認められるものの、骨関節破壊の直接的抑制効果に乏しく、炎症抑制に起因すると考えられる骨破壊進展遅延作用を認めるのみで最終的に骨関節破壊を免れることは困難である。また、キメラ型中和抗体を用いた治療法においては、中和抗体に対するヒト抗キメラ抗体産生に伴う効果の減弱が認められ、臨床的にはメソトレキセートなどの免疫抑制剤との併用を余儀なくされる。更に、炎症性サイトカインを標的とした抗サイトカイン療法および生物学的作用薬の全身投与法においては非罹患諸臓器に与える影響の面で種々の予期せぬ副作用を来す可能性が十分考えられる。
- 15
- 20

発明の開示

- 本発明は、FGF2の機能を阻害、またはその細胞内信号伝達系を遮断することによる、骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法を提供する。また本発明は、FGF2の機能を阻害、またはその細胞内信号伝達系を遮断する蛋白質をコードするベクターを含む、該疾患の治療組成物を提供する。
- 25

FGF2は細胞の分化および発生に重要な役割を果たす増殖因子である (Klagsbrun, M., 1989, Prog. Growth Factor Res. 1:207-235; Mason, I., 1994, Cell 78: 547-552; Bikfalvi, A. et al., 1997, Endocr. Rev. 18:26-45)。FGF2はFGF受容体 (FGFR) を介して正常の発生過程および組織再生に重要な役割を果たしている
5 他、癌増殖および炎症などにも関与する (Basilico, C. and Moscatelli, D., 1992, Adv. Cancer Res. 59:115-165; Klein, S et al., 1997, Experientia Suppl. 79:159-192; Jackson, J. et al., 1997, FASEB J. 11:457-465)。また、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、表皮細胞などの細胞増殖を促進し、血管新生、
10 骨・軟骨形成、および創傷治癒などにおける調節因子としても作用する (Marie, P. et al., 2000, Joint Bone Spine 67:150-156; Boyce, B. et al., 1999, Lab. Invest. 79:83-94; Goldfarb, M. 1996, Cytokine Growth Factor Rev. 7:311-325; Chikazu, D. et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:31444-31450; Yamashita, A. et al., 2002, J. Immunol. 168:450-457; Collon-Osdoby, P. et al., 2002, J. Bone Mineral Res. 17:1859-1871)。FGF2は、FGFR1 IIIb、FGFR1 IIIc、FGFR2 IIIc、FGFR3 IIIc、およびFGFR4 に結合することが知られている (Ornitz et al., 1996, J. Biol. Chem., 271:15292-15297)。FGF2がFGFRに結合すると、FGFRのチロシンリン酸化活性により下流のシグナル分子がリン酸化され、Ras、Raf-1、MAPKK、MAPKへとシグナルが伝達される。本発明者らは、このシグナル伝達を阻
15 害する遺伝子を発現するベクターによりシグナル伝達を阻害する遺伝子治療を、炎症性骨疾患に対して適用することを考えた。

そこで本発明者らは、FGF2の機能を阻害する分泌型FGF受容体、並びにFGF2の細胞内信号伝達系を遮断するsprouty-2およびspredをコードするウイルスベクターを作製し、RAモデルラットの疾患関節に投与する遺伝子治療を行なった。その結
25 果、これらのうちいずれのベクターの投与においても関節の炎症が有意に抑制され、さらに該ベクターを投与した関節では、骨量の減少が緩和され、有意な治療

効果を認めた。このように、FGF2の機能阻害またはその細胞内信号伝達系を遮断する蛋白質を発現するベクターを骨疾患部位に局所投与することによって、疾患部位の炎症を抑えると同時に骨破壊も抑制し、症状を有意に改善することに成功した。RAなどの骨破壊を伴う炎症性疾患においては、これまで効果的な治療方法

5 がなかったが、本発明の方法に従った遺伝子治療により、患部の炎症と骨破壊を同時に抑制できる新しい治療が可能となった。ベクターを患部に局所投与すれば、全身投与における副作用を回避することができ、さらにベクターからのシグナル伝達阻害因子の発現により、長期間にわたって治療効果を持続することが可能である。

10 すなわち本発明は、FGF2の機能阻害またはその細胞内信号伝達系の遮断により骨破壊を伴う炎症性疾患を治療する方法、および該治療に用いる医薬組成物に関し、より具体的には、請求項の各項に記載の発明に関する。なお本発明は、請求項の各項に記載の発明の1つまたは複数（または全部）の所望の組み合わせからなる発明も意図されている。すなわち本発明は、より具体的には、

15 (1) 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法であって、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2) -FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸をコードするベクターを投与する工程を含む方法、

(2) ベクターが一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである、(1)に記載の方法、

20 (3) 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、(2)に記載の方法、

(4) 該シグナル伝達を阻害する蛋白質が、可溶性FGF受容体、sprouty-2、およびspredからなる群より選択される、(1)から(3)のいずれかに記載の方法、

(5) 該疾患が関節リウマチである、(1)から(4)のいずれかに記載の方法

25 、

(6) 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療組成物であって、線維芽細胞増殖因子-2 (F

GF2)－FGF受容体1－Ras－Raf－MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸をコードするベクター、および薬学的に許容される担体を含む組成物、

5 (7) ベクターが一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである、(6)に記載の組成物、

(8) 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、(7)に記載の組成物、

10 (9) 該シグナル伝達を阻害する蛋白質が、可溶性FGF受容体、sprouty-2、およびspredからなる群より選択される、(6)から(8)のいずれかに記載の組成物、

(10) 該疾患が関節リウマチである、(6)から(9)のいずれかに記載の組成物、に関する。

本発明は、骨疾患における炎症と骨破壊の一元的治療に対して、FGF2の機能制
15 御、及びその細胞内信号伝達系の遮断によりRAを治療する方法を提供する。つまり、本発明者らは、FGF2－FGF受容体1－Ras－Raf－MAPキナーゼ系を介した一連のFGF2シグナル伝達系の細胞外および/または細胞内における阻害を治療戦略として提供した。FGF2シグナル伝達系を阻害する因子をコードするベクターを患部に投与することにより、患部の炎症と骨破壊とを同時に抑制することができる。FGF2
20 はその受容体 (FGFR) に結合すると二量体を形成し、チロシンの自己リン酸化が誘導され活性化される。活性化したFGFRチロシンキナーゼはSrcキナーゼ、ホスホリパーゼC γ (PLC γ) 等の酵素の他、Shc、FGF receptor substrate 2 (FRS2) などのアダプター蛋白質のチロシンをリン酸化する。リン酸化されたShcおよびFRS2はGrb2と結合し、Sosを細胞膜へリクルートし、SosによってRasが活性化される。
25 活性型RasはRaf-1キナーゼと結合し、MAPKキナーゼを活性化、さらにMAPキナーゼが活性化される。FRS2にはSHP2というチロシンホスファターゼが結合する。FGF2

—FGF受容体1—Ras—Raf—MAPキナーゼを介するシグナル伝達とは、上記に示した FGF2からMAPKに至るシグナル伝達である。このシグナル伝達の阻害とは、例えば FGF2から、FGF受容体1、Ras、Raf、およびMAPキナーゼへと至るシグナル伝達の 1 つまたはそれ以上の所望のポイントを阻害することである。例えばFGF2、FGF受容
5 体1、Shc、Grb2、Sos、FRS2、SHP2、Ras、Raf、MAPKK、およびMAPKの活性（他のシグナル分子との相互作用またはリン酸化活性など）を阻害することであってよい。また、各シグナル分子の発現（転写、翻訳、またはmRNA・蛋白質の安定性など）を阻害することであってよい。

FGF2—FGF受容体1—Ras—Raf—MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白
10 質または核酸としては、例えばこのシグナル伝達に関与する分子に対するアンチセンス核酸、RNA干渉（RNAi）効果を有するRNA、リボザイム、または抗体などが挙げられる。アンチセンス核酸としては、シグナル分子をコードする遺伝子のセンス鎖の連続した13ヌクレオチド以上、好ましくは14ヌクレオチド以上、さらに好ましくは15ヌクレオチド以上、さらに好ましくは20ヌクレオチド以上に対す
15 るアンチセンス配列を含む核酸が挙げられる。例えば、初期転写配列中のエクソン—イントロン境界、イントロン—エクソン境界、翻訳開始コドンを含む領域、または成熟mRNA中の蛋白質コード配列に対するアンチセンス配列を含む核酸などが好ましい。また、リボザイムとしては、標的遺伝子のmRNAを切断するRNA切断型リボザイムを利用できる。たとえば、ハンマーヘッド型リボザイム（Rossi et al
20 . (1991) Pharmac. Ther. 50: 245-254）およびヘアピン型のリボザイム（Hampel et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 299-304, and U.S. Pat. No. 5,254,678）が、塩基配列特異的な切断作用を有することが知られている。これらのリボザイムは、アンチセンス配列がハイブリダイズするポリヌクレオチドの特定の位置を、その触媒作用によって切断することができる。またシグナル伝達を阻害する抗体
25 体としては、シグナル分子の活性に重要なドメイン、例えばリン酸化部位または他のシグナル分子との相互作用部位に結合する抗体が用いられる。

また、本発明においてさらに好ましい態様では、FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質成分をベクターから発現させる。好ましい手段としては、大きく、①可溶性FGF受容体遺伝子を用いたシグナル伝達の阻害、②細胞内シグナル伝達系（Ras-Raf-MAPキナーゼ系）を阻害する遺伝子を用いた阻害の二通りが挙げられる。発明の実施形態として具体的に以下に述べる。

1. 可溶性FGF受容体遺伝子を用いた遺伝子治療

現在までの諸家の研究により、滑膜組織においてはFGF受容体1から受容体4が、破骨細胞においては受容体1のみが発現していること、また、破骨細胞の分化および生物学的機能発現においてFGF受容体1-MAPK（p42/p44MAPK）を介したシグナル伝達が重要であることが報告されている。本発明の好ましい態様では、ヒト可溶性FGF受容体（human soluble FGF receptor: hsFGFR）遺伝子をベクターにより直接的に滑膜組織に導入する遺伝子治療法によりFGF2を細胞外で機能阻害する。可溶性FGF受容体とは、FGF受容体の細胞外ドメインにあるFGF2結合ドメインを含む蛋白質であって、細胞で発現させることにより細胞外に分泌される蛋白質である。分泌蛋白質をコードする核酸は、FGF受容体遺伝子の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインをコードする核酸を欠失させることにより得られる。細胞外に分泌された可溶性FGF受容体は、FGF2と結合し、FGF2と内因性FGFR-1との結合と干渉することによりFGF2のシグナル伝達を阻害する。可溶性FGF受容体遺伝子を組み込んだベクターを骨破壊部位に投与することにより、炎症と骨破壊を抑制する顕著な効果が得られる。可溶性FGF受容体としては、FGF2と結合するFGF受容体のFGF2結合部位を含む分泌型蛋白質であればよく、天然の蛋白質および遺伝子組み換えにより人為的に作り出した蛋白質が含まれる。具体的には、例えばFGFR1a IIIb (Accession NM_015850, NP_056934, AAB19502, Isacchi, A. et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:1906; Johnson, D.E. et al., 1991, Mol. Cell. Biol. 11:4627-4634)、FGFR1b(IIIb) (Accession NM_023106, NP_075594, AAB19502, Isacchi, A

. et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:1906; Johnson, D.E. et al., 1991, Mol. Cell. Biol. 11:4627-4634)、FGFR1a(IIIc) (Accession NM_015850, NP_056934, AAB19502, Isacchi, A. et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:1906)、FGFR1b(IIIc) (Accession NM_023106, NP_075594, AAB19502, Isacchi, A. et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:1906)、FGFR2(IIIc) (Accession NM_022962, NP_075251, Johnson, D.E. et al., 1991, Mol. Cell. Biol. 11:4627-4634)、FGFR3(IIIc) (Accession P22607, Keegan, K. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:1095-1099)、FGFR4 (Accession AAB25788, Ron, D. et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:5388-5394) の細胞外ドメインを含む分泌型蛋白質が挙げられる。特に好ましくは、スプライシングバリエーションとして自然界に存在し、なおかつFGF-2の天然のインヒビターとしての作用を有するFGFR1 IIIa、およびヒト線維芽細胞増殖因子受容体分泌型 (human fibroblast growth factor receptor (FGFr) secreted form) などが挙げられる。例えばFGFr分泌型遺伝子の塩基配列 (配列番号: 1) はAccession number M34188、アミノ酸配列 (配列番号: 2) はprotein ID AAA35839に示されている (Johnson, D.E. et al., Mol. Cell. Biol. 10 (9), 4728-4736 (1990))。

2. 細胞内シグナル伝達系の阻害による治療

sprouty-2およびsprouty関連Rasシグナル抑制因子であるspredはRasに結合し、Rafのリン酸化と活性化を妨害してMAPキナーゼの活性化を抑制することでFGF受容体と上皮増殖因子 (epidermal growth factor: EGF) 受容体の生理作用を調節している。このsprouty-2またはspred遺伝子を遺伝子治療により滑膜組織および/または周囲の骨格筋に導入、局所で発現させることによりFGF2分子を介した滑膜炎症ならびに破骨細胞性骨吸収を抑制し治療効果を発揮する。sprouty 2 [Homo sapiens] の塩基配列 (配列番号: 3) およびアミノ酸配列 (配列番号: 4) はAccession number NM_005842およびNP_005833に、Spred-2 [Mus musculus] の塩基配列 (配列番号: 5) およびアミノ酸配列 (配列番号: 6) はAccession number AB06

3496およびBAB62849、ヒトSpred-2はAccession number NM_181784およびNP_861449に示されている (Hacohen, N. et al., Cell 92 (2), 253-263 (1998); Glienke, J. et al., Mech. Dev. 96 (1), 91-99 (2000); Lim, J. et al., J. Biol. Chem. 275 (42), 32837-32845 (2000); Wong, E.S. et al., J. Biol. Chem. 276 (8), 5866-5875 (2001); Yusoff, P. et al., J. Biol. Chem. 277 (5), 3195-3201 (2002); Egan, J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (9), 6041-6046 (2002); Wakioka, T. et al., Nature 412 (6847), 647-651 (2001))。また、Ras/Raf/MEK/MAPKを介したFGFシグナル伝達系のアンタゴニストとして作用するSef (similar expression to fgf genes) を用いることができる (Furthauer M, et al., Nat. Cell Biol., 2002, 4(2):170-4)。また、fgf8、fgf3、sprouty4なども利用し得る。

Sef (similar expression to fgf genes) (IL17RLM, FLJ35755, IL-17RDとも称す) 遺伝子の塩基配列は、Accession number NM_017563の523から2307番目、Sefのアミノ酸配列は、NP_060033に例示されている (Clark, H.F., et al., Genome Res. 13 (10), 2265-2270 (2003); Yang, R.B., et al., J. Biol. Chem. 278 (35), 33232-33238 (2003); Kovalenko, D., et al., J. Biol. Chem. 278 (16), 14087-14091 (2003); Furthauer, M., et al., Nat. Cell Biol. 4 (2), 170-174 (2002); Tsang, M., et al., Nat. Cell Biol. 4 (2), 165-169 (2002))。FGF8 (fibroblast growth factor 8) 遺伝子の塩基配列は、Accession number NM_033165の237から782番目、FGF8 (成熟蛋白質) のアミノ酸配列は、NP_149355の23から204番目に例示されている (Gnanapragasam, V.J., et al., Br. J. Cancer 88, 1432-1438 (2003); Gnanapragasam, V.J., et al., Oncogene 21, 5069-5080 (2002); Tanaka, S., et al., Dig. Dis. Sci. 46, 1016-1021 (2001); Ghosh, A.K., et al., Cell Growth Differ. 7, 1425-1434 (1996))。FGF3 (fibroblast growth factor 3) 遺伝子の塩基配列は、Accession number NM_005247の543から1208番目、FGF3 (成熟蛋白質) のアミノ酸配列は、NP_005238の18から239番目に例示されている

(Kong, M., et al., J. Biol. Chem. 277 (18), 15962-15970 (2002); Galdemard, C., et al., J. Biol. Chem. 275 (23), 17364-17373 (2000); Thompson, L. M., et al., Genomics 11 (4), 1133-1142 (1991))。sprouty4 (spry4とも称される) 遺伝子の塩基配列は、Accession number NM_030964の188から1153番目、sprouty 4のアミノ酸配列は、NP_112226に例示されている (Sasaki, A., et al., Nat. Cell Biol. 5 (5), 427-432 (2003); Leeksa, O. C., et al., Eur. J. Biochem. 269 (10), 2546-2556 (2002))。

また、上記した可溶性FGFR、およびFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質は、天然のアミノ酸を改変された蛋白質、例えば自然界に存在するパリアントおよび他の哺乳動物のカウンターパートを用いることができる。具体的には、天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および/または付加したアミノ酸配列を含む蛋白質、天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質と70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ配列を含む蛋白質、ならびに天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質のコード領域の一部または全部を含む核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸がコードする蛋白質であって、FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質は本発明において好適に用いることができる。例えば可溶性FGFRであれば、FGF2と結合する活性を有している分泌蛋白質であるかぎり所望の変異を有していてもよい。またsprouty 2またはSpredの変異体であれば、Rafのリン酸化を阻害する活性を持つものであるかぎり本発明において利用することができる。

アミノ酸の置換、欠失、および/または付加においては、改変されるアミノ酸数は、通常15以内、好ましくは11以内、より好ましくは9以内、より好ましくは7以内、より好ましくは5以内である。特にアミノ酸を保存的に置換した蛋白質は活性

が維持されやすい。保存的置換は、例えば塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。アミノ酸配列の同一性は、例えばBLASTPプログラム (Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410) を用いて決定することができる。具体的にはblastpプログラムを用いることができる。例えばNCBI (National Center for Biotechnology Information) のBLASTのウェブページにおいてLow complexityを含むフィルターは全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて検索を行う (Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649-656)。

例えば2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム (Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、例えば天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算する。また、ハイブリダイゼーションにおいては、天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質のコード配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5×SSC、7%(W/V) SDS、100 μ g/ml 変性サケ精子DNA、5×デンハルト

液（1×デンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む）を含む溶液中、48℃、好ましくは50℃、より好ましくは52℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度、より好ましくは60℃、さらにこの好ましくは65℃、最も好ましくは68℃で2×SSC中、好ましくは1×SSC中、より好ましくは0.5×SSC中、より好ましくは0.1×SSC中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

上記のシグナル伝達を阻害する核酸または蛋白質の遺伝子を組み込むベクターとしては、ウイルスベクター、およびプラスミドベクター等のnaked DNA（裸のDNA）など所望のベクター系を用いることができるが、ウイルスベクターが特に好適である。ウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、フォウルポックスウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが挙げられる。これらのウイルスベクターは、遺伝子工学的に組み換えウイルスベクターとして調製することができる。

「組み換え」ウイルスベクターとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるウイルスベクターである。なお、組み換えポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドの両端が自然の状態と同じようには配置していないポリヌクレオチドを言う。より具体的には、例えば人為的にポリヌクレオチド鎖が繋ぎ替えられたり、あるいは新たに生成されたポリヌクレオチドである。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。

組み換えウイルスベクターは当業者に周知の方法に従って調製することができる。例えば、遺伝子治療などに最も普通に利用されるアデノウイルスベクターの作製は、斎藤らの方法および他（Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA

、93巻、1320-24頁；Kanegaeら、1996、Acta Paediatr. Jpn、38巻、182-188頁；
鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58
頁、羊土社；鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁）に従って製造
することができる。また、例えばレトロウイルスベクター（脇本ら、1995、蛋白
5 質核酸酵素、40巻、2508-2513頁）、およびアデノ随伴ウイルスベクター（玉寄ら
、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁）なども、公知の方法により調製す
ることができる。哺乳動物に遺伝子導入可能なその他のウイルスベクターを製造
するための詳細は、組換えワクシニアウイルスを製造する方法としては、特表平
6-502069、特公平6-95937、特公平6-71429が知られている。組換えパピローマウ
10 イルスを製造する方法としては特公平6-34727、特表平6-505626が知られている。
組換えアデノ随伴ウイルスを製造する方法としては、特開平5-308975が知られて
いる。組換えアデノウイルスを製造する方法としては、特表平6-508039が知られ
ている。

ウイルスベクターの中でも、本発明において特に好適なベクターは一本鎖ネガ
15 ティブ鎖RNAウイルスベクターである。一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクター
とは、一本鎖のネガティブ鎖〔すなわち(-)鎖〕RNAをゲノムに有するウイルスま
たはその誘導体であって、遺伝子を宿主細胞に導入するベクター（担体）を言う
。一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスとしては、パラミクソウイルス（Paramyxovirida
e; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含
20 む）、ラブドウイルス（Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ep
hemerovirus属等を含む）、フィロウイルス（Firoviridae）、オルトミクソウイ
ルス（Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like vir
uses 等を含む）、ブニヤウイルス（Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Na
irovirus, および Phlebovirus属等を含む）、アレナウイルス（Arenaviridae）
25 などの科に属するウイルスが含まれる。特に好ましくは、パラミクソウイルス科
のウイルスベクター（本明細書においてこれをパラミクソウイルスベクターと言

う) が用いられる。本発明者らは、FGF2シグナルの阻害因子をコードするパラミクソウイルスベクターの投与が、骨破壊性関節炎の炎症および骨量の減少の両方を顕著に低下させることを実証した。パラミクソウイルスベクターは染色体非組み込み型のRNAウイルスベクターであり、外来遺伝子を一定期間、非常に高いレベルで発現させる特性を持つ。このようなベクターの特性が、本発明の方法における骨破壊性炎症疾患の治療にとって特に好ましい作用を及ぼしたと考えられる。

本発明に用いられ得るパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) のセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1、2、3型等が挙げられる。本発明においてパラミクソウイルスは、好ましくはパラミクソウイルス亜科 (*Paramyxovirinae*) (レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む) に属するウイルス、より好ましくはレスピロウイルス属 (*Respirovirus*) (パラミクソウイルス属 (*Paramyxovirus*) とも言う) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明に用いられ得るレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型 (HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型 (BPIV-3)、センダイウイルス (Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型 (SPIV-10) などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) 等の不完全ウイルスまたは合成したオリゴヌクレオチド等も、ウイルスベクターを製造するための材料として使用することが

できる。

組み換えネガティブ鎖RNAウイルスベクターは、ウイルスゲノムをコードするDNAに適当な転写プロモーターを連結した組み換えDNAを構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、ネガティブ鎖RNAウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させ、このRNPを含むウイルス粒子を形成させることにより生成させることができる。具体的には、通常、(a) ネガティブ鎖RNAウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖（ポジティブ鎖）をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞（ヘルパー細胞）で転写させ、(b) 該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収することにより調製することができる。ベクターDNAから転写されたRNAは NP、L、およびPタンパク質とRNP複合体を形成し、さらにエンベロープ蛋白質を含む外殻に包まれたウイルス粒子が形成する。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466; 国際公開97/16539号; 国際公開97/16538号; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含む所望のパラミクソウイルスベクターおよびその他の(-)鎖RNAウイルスベクターをDNAから再構成させることができる。ネガティブ鎖RNAウイルスは発現さ

れる蛋白質量が極めて高く、遺伝子導入可能な細胞種も極めて広い。また、特にセンダイウイルス (SeV) は霊長類において重篤な有害作用を示さず、本発明においてヒトへの遺伝子治療に好適に用いられる (Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。

- 5 ウイルスベクターは、野生型ウイルスの誘導体であってもよい。誘導体とは、ウイルスの遺伝子導入能を完全には損なわないように、ベクターが搭載するウイルス遺伝子またはウイルス蛋白質を改変したベクターを言う。このような改変は、ベクターの複製能を破壊したり、あるいは抗原性を減弱化したりするために行い得る。例えばウイルスの伝播に必須の遺伝子を欠損させた複製能欠損型ウイルス
- 10 スベクターを用いることができる。パラミクソウイルスベクターDNAにおいては、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子等を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能
- 15 である。このような欠失型ウイルスベクターの製造方法は公知であり、これに従ってまたは順じて製造することができる (国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照)。ベクターからの外来遺伝子の発現量は、例えば、その遺伝子の上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる (国際公開番号 W001/18223)。また、ウイルスベクターは、このウイルス以外に由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターであってもよい。このようなエンベロープ蛋白質には、VSV-Gなどが挙げられる (国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照)。
- 20

- またウイルスが持つアクセサリー遺伝子を欠損させてもよい。例えばSeVのアクセサリー遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞に
- 25 おける遺伝子発現および複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する (Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272;

Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., W001/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、in vivo またはex vivoにおける毒性の低い遺伝子導入用ウイルスベクターとして特に有用である。

回収したウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。

- 5 精製方法はフィルトレーション（濾過）、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質（但しキャリアーおよび安定剤として加えた蛋白質は除く）のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公
- 10 昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

- ウイルスの力価は、例えばCIU（Cell-Infected Unit）測定または赤血球凝集活性（HA）の測定することにより決定することができる（W000/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999; Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74 (1990))。また、GFP（緑色蛍光蛋白質）などのマーカー遺伝子
- 20 子を搭載したベクターについては、マーカーを指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができる（例えばGFP-CIUとして）。このよ

うにして測定した力価は、CIUと同等に扱うことができる（W000/70070）。得られたベクターは、骨破壊を伴う炎症性疾患に対する予防剤および治療剤となる。特に上記のベクターは、関節リウマチの予防剤または治療剤として有用である。

ウイルスベクターを含む組成物の製造においては、ベクターは必要に応じて薬学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。具体的には、例えば滅菌水、生理食塩水、培養液、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などと適宜組み合わせ、製剤化することが考えられる。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。本発明の組成物は、水溶液、カプセル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。製造されたウイルスベクターを含む組成物は試薬または医薬として有用である。該組成物は、例えば、破骨細胞形成を抑制するための試薬および医薬として、骨破壊および／または炎症を抑制するための試薬および医薬として、または骨破壊疾患を予防または治療するための医薬として用いられる。

上記のように製造したベクターを骨破壊を伴う炎症性疾患患者の患部に投与することにより、症状を著しく軽減させることができる。ここで「骨破壊を伴う炎症性疾患」とは、骨の破壊、減少、吸収、および／または粗鬆化と炎症とを伴う疾患を言う。このような疾患としては、特に関節リウマチ（RA）が挙げられる。本発明の方法を用いて、関節リウマチの炎症および骨破壊を抑制することができる。その他にも、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、種々の膠原病に続発する多発性関節炎などの治療も本発明の対象となる。

RAは関節滑膜の持続的な炎症で、その増殖および肥厚の結果、関節軟骨およびその周囲の骨破壊により、関節の変形および骨破壊に到る慢性疾患である。本発明は、RAの滑膜炎および骨破壊の一元的治療に対して、FGF2の機能制御、及びその細胞内信号伝達系の遮断によりRAを治療する方法を提供する。つまり、本発明

者らは、FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼ系を介した一連のFGF2シグナル伝達系の細胞外及び細胞内阻害をRAに対する治療戦略として提供した。

1. RA滑膜炎の抑制について

RA滑膜病変の主体は増殖性滑膜炎である。この増殖性滑膜炎において(病的)血管新生という病態生理学的現象に因って形成された新生血管は、①滑膜組織への栄養分供給路、②炎症細胞の到達経路、③破骨細胞前駆細胞の到達経路、④サイトカインなどの疾患メディエーターの到達経路という面でRA病態形成及び進展、骨破壊において重要である。従って血管新生因子の機能制御によるRA治療戦略は合目的であり、滑膜における血管床の減少に伴って炎症が抑制されるものと考えられる。また、本発明は血管新生因子の中でもRAにおける炎症及び骨破壊の特異的増悪因子であるFGF2の機能制御を標的としていることから、より選択的かつ強力な抗滑膜炎作用を発揮するものと考えられる。

2. RA骨破壊の抑制について

先にも述べたように、従来の技術では関節炎症と骨破壊を一元的かつ有効に治療することは困難であった。本発明における標的分子であるFGF2は、血管新生因子としての生物学的作用のみならず、骨破壊において中心的役割を担う破骨細胞の分化、機能促進因子であることも報告されている。従って、FGF2の機能制御により滑膜炎進展の抑制に留まらず、破骨細胞分化および機能を直接的に抑制することが可能であり、RA治療における究極の目標である滑膜炎、骨関節破壊という両現象の抑制が可能となる。

3. ドラッグ・デリバリーシステムについて

RAに対して有効とされる蛋白製剤を経口的あるいは経静脈的に全身投与した場合、①関節滑膜局所への薬剤の到達、②局所における有効濃度の獲得、③全身諸臓器における副作用の発現、などの解決すべき重要な問題点が残される。一方、本発明による遺伝子治療法は、ベクターを用い滑膜組織に治療遺伝子を発現させることで、関節局所において有効な遺伝子発現レベルを一定期間持続的に獲得す

ることが可能となる。この遺伝子治療技術を用いることで、蛋白が局所あるいは全身で高濃度になることを避けることが可能である。

4. 生物学的創薬技術について

- 本発明はFGF2の機能を抑制する遺伝子、またはFGF2レセプター以降の細胞内シグナル伝達系を遮断する遺伝子が組み込まれたベクターを投与する方法を含む。
- つまり、細胞内シグナル伝達系における単一酵素の選択的阻害によって、より疾患・病態特異的な治療薬剤の製造及び治療が可能となる。このように本発明によって疾患特異的分子の選択的阻害という理想的な生物学的創薬が可能となる。

- ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。投与経路は適宜選択することができるが、骨破壊性の炎症がある患部に特異的に到達するように、局所注入されるか、あるいは適当なドラッグデリバリーシステムにより患部に到達するように投与されることが好ましい。パラミクソウイルスベクターであれば、投与されるベクターの濃度は好ましくは約 10^5 CIU/mlから約 10^{11} pfu/ml、より好ましくは約 10^7 CIU/mlから約 10^9 CIU/ml、最も好ましくは約 1×10^8 CIU/mlから約 5×10^8 CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。投与量は、1箇所あたり好ましくは約 10^5 pfuから 10^{11} pfu、より好ましくは約 10^7 pfuから 10^9 pfu、最も好ましくは約 10^8 pfuから 10^9 pfuで投与する。複数のベクターを組み合わせで投与する場合には、それぞれを上記の量で投与するとよい。投与は1箇所または複数箇所（2, 3, 4, 5～10箇所）に投与してよい。エキスビゴ投与の場合は、体外（例えば試験管またはシャーレ内）で患者から取り出した細胞などにベクターを接触させる。MOIは1～500の間で投与することが好ましく、より好ましくは2～300、さらに好ましくは3～200である。その後、細胞を患者に注入する。本発明のベクターを含む組成物の投与対象としては、ヒト、およびサル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての非ヒト哺乳動物が含まれる。

図面の簡単な説明

図 1 は、Raf阻害薬投与による破骨細胞形成の抑制を示す図である。結果は平均 ± 標準偏差で表した。統計学的解析はone-way ANOVAを用いた。* : 危険率 $p < 0.01$ で有意差ありと判定した。(n=各 8 培養群 (culture groups))。

図 2 は、sFGFR遺伝子導入によるAIA治療効果を示す図である。図中、ベクターのインジェクションはsFGFR遺伝子を搭載したSeVをフットパッド投与した時点を示す。結果は平均 ± 標準誤差で表した。統計学的解析はMann-Whitney U-testを用い、* : 危険率 $p < 0.01$ で有意差ありと判定した。

図 3 は、spry2遺伝子導入によるAIA治療効果を示す図である。図中、ベクターインジェクションはspry2遺伝子を搭載したSeVをフットパッド投与した時点を示す。結果は平均 ± 標準誤差で表した。統計学的解析はMann-Whitney U-testを用いた。# : 危険率 $p < 0.05$ 、* : 危険率 $p < 0.01$ で有意差ありと判定した。

15 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

[実施例 1] 培養破骨細胞形成に与えるRaf阻害薬の影響

20 1. ラット骨髓由来マクロファージの分離培養

ラット骨髓由来マクロファージはマクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage colony stimulating factor: M-CSF) を用いて分離培養した。8頭のチャールズリバーグレードLewisラット (6週齢、KBTオリエンタル、鳥栖、佐賀) を用い、麻酔下に頸椎脱臼により犠牲死させ、頸動脈を切断し脱血した。無菌下に両側の大腿骨及び脛骨の骨幹部を摘出、培養液 (α -modified essential medium: α -MEM (GIBCO BRL, Rockville, Maryland, USA)) を骨髓腔に注入し骨髓細胞を採取した

。0.727% NH_4Cl -0.017% Tris-Cl (pH7.2)-phosphate buffered saline (PBS) 溶液を用いて赤血球を洗浄後、10%仔牛血清 (fetal bovine serum: FBS)、リコンビナントヒトM-CSF (recombinant human M-CSF: rhM-CSF, 10 ng/ml, CHEMICON International, Inc. Temecula, CA) 含有 α -MEMを用い180 mlフラスコに 5×10^6 個撒いた。3日後、PBSにて洗浄し、0.05% trypsin/0.02% EDTA含有PBSで接着細胞を剥がし、180 mlフラスコに 10^6 個撒いた。3日後、同様の方法で細胞を回収し液体窒素中に保存した。この方法で分離したラット骨髓由来マクロファージをM-CSF依存ラット骨髓マクロファージ (M-CSF-dependent bone marrow macrophages: MDBM) と定義した。

10 2. 破骨細胞形成に与えるRaf阻害薬の影響

予め調整した10% FBS、rhM-CSF (10 ng/ml)、recombinant human soluble receptor activator of nucleus factor-kappa B ligand (sRANKL, 50 ng/ml, Peprotech EC, Ltd. London, U.K.)、及びrecombinant human FGF basic (rhFGF-2, 10 ng/ml, Genzyme/Techne, Minneapolis, MN, USA) 含有 α -MEMを用い、96穴プレートにMDBMを 5×10^3 個/wellで撒いた。接着後、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解したRaf阻害薬 (Raf-1 Kinase Inhibitor I, Calbiochem, San Diego, CA, USA) を添加した ($10 \mu\text{l/well}$)。コントロール群にはDMSOのみを同量添加した。3日後に培養液を交換し、再度Raf阻害薬を添加した。培養開始より7日目にleukocyte acid phosphatase kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)を用いて酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色を施行、TRAP陽性の3核以上を有する多核巨細胞を破骨細胞と定義し形成破骨細胞数を比較検討した。その結果、Raf阻害薬投与により濃度依存的に破骨細胞形成が抑制され、いずれの濃度においてもコントロールとの有意差が認められた (図1)。

25 [実施例2] AIAに与えるsFGFR遺伝子導入の影響: FGF-2細胞外遮断
(方法)

1. AIAモデル

AIAは、結核菌の死菌 (Mycobacterium Butyricum Desiccated: MBD, Difco, Detroit, MI, USA) 1 mgを鉱物油 (NACALAI TESQUE, 京都) 100 μ lに懸濁し、ラットの尾根部に皮下投与した。

5 2. FGF-2細胞外遮断実験プロトコール

組換えセンダイウイルスベクター (recombinant Sendai virus vector: SeV) を用いたラットへの直接的遺伝子導入法により炎症局所で標的遺伝子を発現させ、関節炎に与える影響を検討した。具体的には、関節炎の発症を確認し、アジュバント投与後14日目にAIA+sFGFR群 (n=40足) では可溶性FGFレセプター遺伝子 (soluble FGF receptor: sFGFR, 配列番号: 1) 搭載SeV (SeV-sFGFR) を、対照群のAIA+luciferase群 (n=28足) ではホタルルシフェラーゼ遺伝子搭載 (SeV-luciferase) をそれぞれ 10^8 pfu/足でフットパッドに投与した。

3. 後肢容積の測定

関節炎による後肢腫脹を定量化する目的でボリウムメーター (MK-550; 室町器械、東京) を用いて後肢容積 (hind paw volume: hpv) を経時的に測定した。

4. レントゲン学的骨・関節破壊の評価

レントゲン学的骨・関節破壊を検討する目的で、Day21およびDay28でラットを犠牲死させ、下腿の中央部で後肢を切断し軟線撮影 (CMB-2; ソフテックス社、東京) を施行し、レントゲン学的骨・関節破壊の程度を5段階に分類し評価した。本実施例のレントゲン学的骨・関節破壊指数 (Radiological Index: RI) は以下の通りである。(0: 所見なし、1: 軽度の骨萎縮及び軟部陰影の腫脹、2: 関節裂隙の狭小化及び中等度の骨萎縮、3: 骨・軟骨ビランまたは中等度の関節破壊、4: 高度の骨破壊による関節構造の消失)。

〈結果〉

図2Aに経時的後肢容積を示す。Day21における後肢容積はAIA+sFGFR群が 3.06 ± 0.1 、AIA+luciferase群が 3.93 ± 0.11 ml、Day28においてはAIA+sFGFR群が 2.85 ± 0

1. AIA+luciferase群が 3.29 ± 0.12 mlであり、いずれの時点においてもsFGFR遺伝子導入によるFGF-2細胞外シグナル遮断により後肢腫脹が有意に抑制された。

図2BにDay14からDay21における容積変化率を示す。その結果、AIA+sFGFR群が 0.18 ± 0.07 、AIA+luciferase群が 0.86 ± 0.09 mlであり、ベクター投与後7日における容積変化率においてもFGF-2細胞外シグナル遮断により有意に抑制された。

図2Cにレントゲン学的骨・関節破壊指数を示す。Day21ではAIA+sFGFR群が 1.42 ± 0.29 (n=12足)、AIA+luciferase群が 1.9 ± 0.28 (n=10足)、Day28ではAIA+sFGFR群が 1.27 ± 0.18 (n=26足)、AIA+luciferase群が 3.0 ± 0.21 (n=14足)であり、Day28においてFGF-2細胞外シグナル遮断により骨・関節破壊が有意に抑制された。

[実施例3] AIAに与えるspry2遺伝子導入の影響： FGF-2細胞内シグナル遮断
(方法)

1. AIAモデル

結核菌の死菌 (Mycobacterium Butyricum Desiccated: MBD, Difco) 1 mgを鉱物油 (NACALAI TESQUE) 100μ lに懸濁し、ラットの尾根部に皮下投与した。

2. FGF-2細胞内遮断実験プロトコール

組換えセンダイウイルスベクター (recombinant Sendai virus vector: SeV) を用いたラットへの直接的遺伝子導入法により炎症局所で標的遺伝子を発現させ、関節炎に与える影響を検討した。具体的には、関節炎の発症を確認し、アジュバント投与後14日目にAIA+spry2群 (n=33足) ではhuman sprouty2遺伝子 (spry2; 配列番号: 3) 搭載SeV (SeV-spry2) を、対照群のAIA+luciferase群 (n=33足) ではホタルルシフェラーゼ遺伝子搭載SeV (SeV-luciferase) をそれぞれ 10^8 pfu/足でフットパッドに投与した。

3. 後肢容積の測定

関節炎による後肢腫脹を定量化する目的でボリュームメーター (MK-550; 室町器械) を用いて後肢容積 (hind paw volume: hpv) を経時的に測定した。

4. レントゲン学的骨・関節破壊の評価

レントゲン学的骨・関節破壊を検討する目的で、Day21およびDay28でラットを犠牲死させ、下腿の中央部で後肢を切断し軟線撮影（CMB-2；ソフテックス社）を施行し、レントゲン学的骨・関節破壊の程度を5段階に分類し評価した。本実施例

5 のレントゲン学的骨・関節破壊指数（Radiological Index: RI）は以下の通りである。（0：所見なし、1：軽度の骨萎縮及び軟部陰影の腫脹、2：関節裂隙の狭小化及び中等度の骨萎縮、3：骨・軟骨ビランまたは中等度の関節破壊、4：高度の骨破壊による関節構造の消失）。

〈結果〉

10 図3Aに経時的後肢容積を示す。Day21における後肢容積はAIA+spry2群が 3.33 ± 0.1 、AIA+luciferase群が 3.85 ± 0.12 ml、Day28においてはAIA+spry2群が 3.07 ± 0.12 、AIA+luciferase群が 3.38 ± 0.16 mlであり、いずれの時点においてもspry2遺伝子導入によるFGFR1/Ras/Raf/MAPKを介したFGF-2細胞内シグナル遮断により後肢腫脹が有意に抑制された。

15 図3BにDay14からDay21における容積変化率を示す。その結果、AIA+spry2群が 0.21 ± 0.07 、AIA+luciferase群が 0.77 ± 0.08 mlであり、ベクター投与後7日における容積変化率においてもFGF-2細胞内シグナル遮断により後肢腫脹が有意に抑制された。

図3Cにレントゲン学的骨・関節破壊指数を示す。Day21ではAIA+spry2群が 1.36 ± 0.20 （n=11足）、AIA+luciferase群が 2.27 ± 0.33 （n=11足）、Day28ではAIA+spry2群が 1.82 ± 0.19 （n=22足）、AIA+luciferase群が 3.0 ± 0.28 （n=22足）であり、いずれの時点においてもFGF-2細胞内シグナル遮断により骨・関節破壊が有意に抑制された。

20

25 産業上の利用の可能性

本発明により、「FGF2の機能阻害またはそのシグナル伝達経路の阻害」という

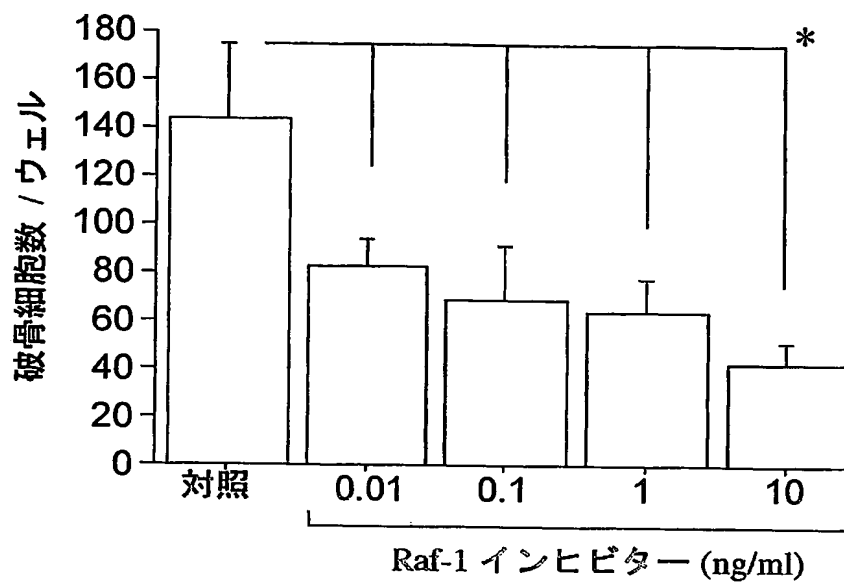
概念のもとより疾患特異的かつ有効で更により安全な生物学的創薬が可能となる。また、RA治療戦略において血管新生因子FGF2分子を標的とすることで、関節炎症の抑制のみならず、病期進展の抑制、更に骨破壊に至らないようにする有効な治療法が確立される。

請求の範囲

1. 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法であって、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2) —FGF受容体1—Ras—Raf—MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸をコードするベクターを投与する工程を含む方法。
5
2. ベクターが一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである、請求項1に記載の方法。
3. 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項2に記載の方法。
- 10 4. 該シグナル伝達を阻害する蛋白質が、可溶性FGF受容体、sprouty-2、およびs predからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。
5. 該疾患が関節リウマチである、請求項1に記載の方法。
6. 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療組成物であって、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF 2)—FGF受容体1—Ras—Raf—MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質
15 または核酸をコードするベクター、および薬学的に許容される担体を含む組成物。
7. ベクターが一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである、請求項6に記載の組成物。
8. 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである
20 、請求項7に記載の組成物。
9. 該シグナル伝達を阻害する蛋白質が、可溶性FGF受容体、sprouty-2、およびs predからなる群より選択される、請求項6に記載の組成物。
10. 該疾患が関節リウマチである、請求項6に記載の組成物。

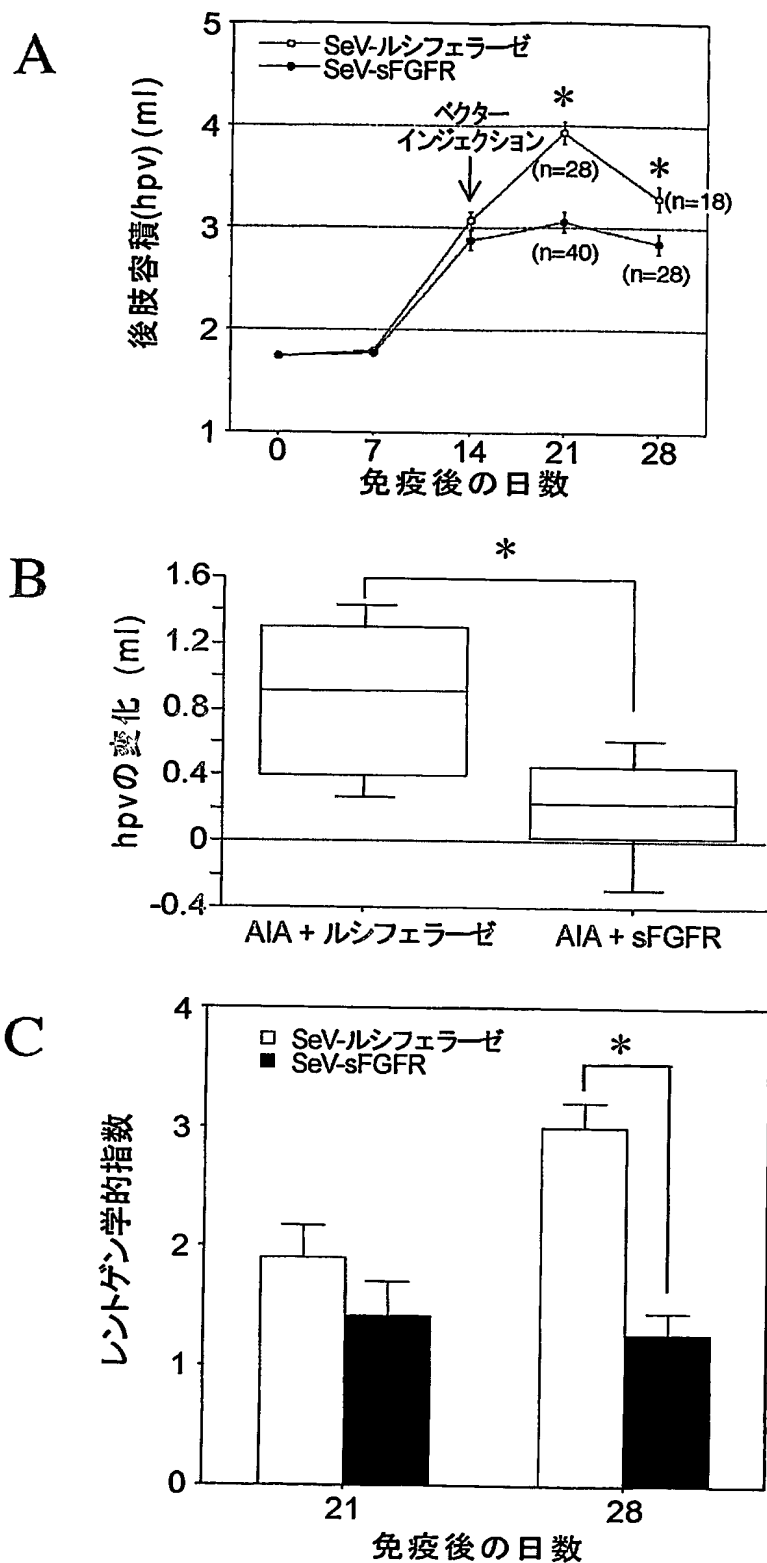
1 / 3

図 1



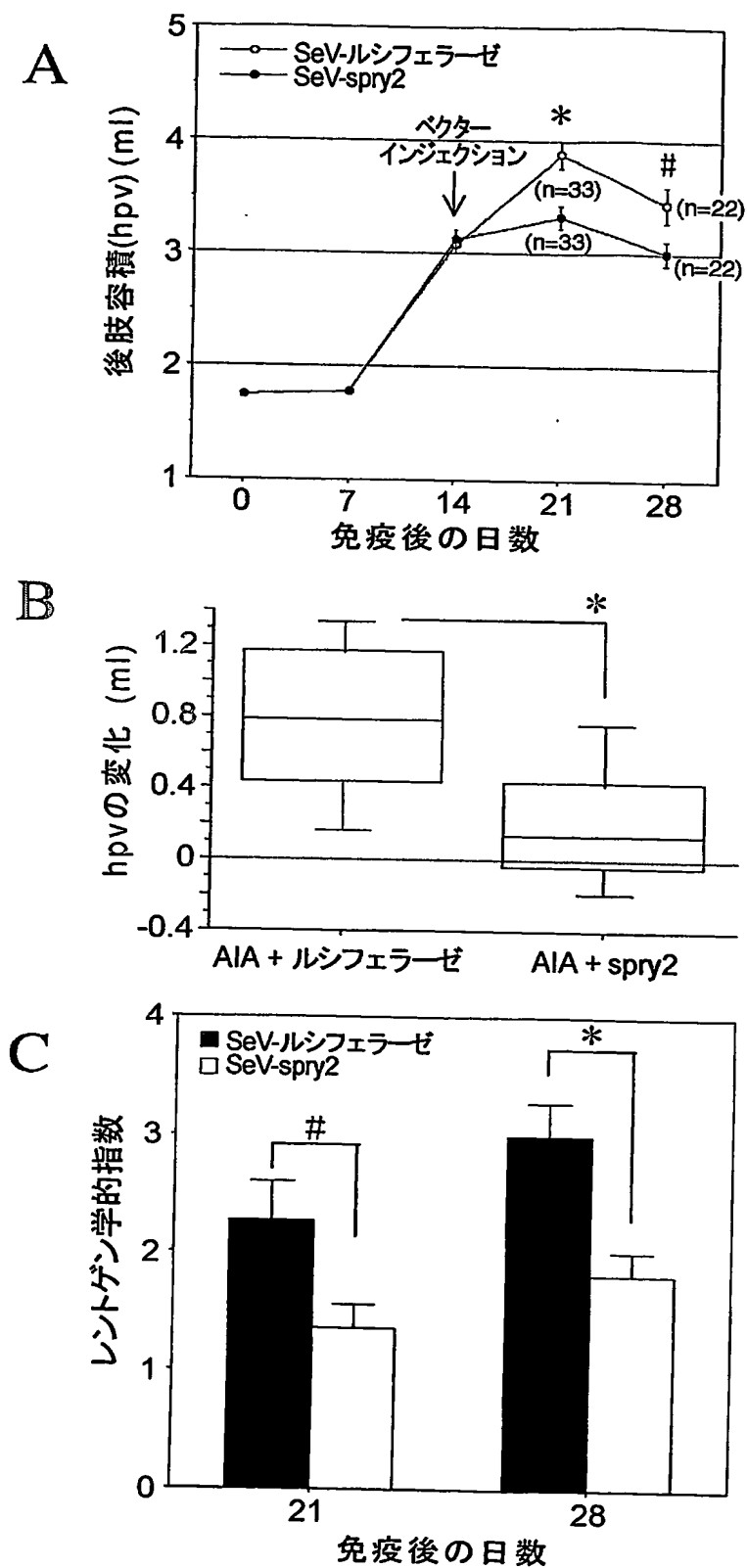
2 / 3

図 2



3 / 3

図 3



SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Method for treating inflammatory diseases
associated with bone destruction

<130> D3-A0206P

<150> JP 2003-075964

<151> 2003-03-19

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

<223>

<400> 1

atg tgg agc tgg aag tgc ctc ctc ttc tgg gct gtg ctg gtc aca gcc 48

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala

1 5 10 15

aca ctc tgc acc gct agg ccg tcc ccg acc ttg cct gaa caa gat gct 96

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Asp Ala

20 25 30

ctc ccc tcc tcg gag gat gat gat gat gat gac tcc tct tca gag 144

Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu

35 40 45

gag aaa gaa aca gat aac acc aaa cca aac ccc gta gct cca tat tgg 192

Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp

50 55 60

Ala Pro Val Phe Val Gly Gln Ser Thr Gly Lys Glu Thr Thr Val Ser
 225 230 235 240

ggg gct caa gtt cct gtg ggc agg ctc agt tgc ccc cga atg gga tca 768
 Gly Ala Gln Val Pro Val Gly Arg Leu Ser Cys Pro Arg Met Gly Ser
 245 250 255

ttc ctc acg ctt cag gca cac aca ctc cat ctc agt agg gat cta gcc 816
 Phe Leu Thr Leu Gln Ala His Thr Leu His Leu Ser Arg Asp Leu Ala
 260 265 270

aca tcc ccc agg act agt aac aga ggt cac aaa gtg gag gtg agc tgg 864
 Thr Ser Pro Arg Thr Ser Asn Arg Gly His Lys Val Glu Val Ser Trp
 275 280 285

gaa cag agg gct gca ggg atg ggt ggt gct ggt ctg 900
 Glu Gln Arg Ala Ala Gly Met Gly Gly Ala Gly Leu
 290 295 300

<210> 2
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
 1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Asp Ala
 20 25 30

Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu
 35 40 45

Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp
 50 55 60

Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala
 65 70 75 80

Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr

85 90 95
Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile
100 105 110
Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser
115 120 125
Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu
130 135 140
Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser
145 150 155 160
Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val
165 170 175
Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro
180 185 190
Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys
195 200 205
Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys Val Ile Met
210 215 220
Ala Pro Val Phe Val Gly Gln Ser Thr Gly Lys Glu Thr Thr Val Ser
225 230 235 240
Gly Ala Gln Val Pro Val Gly Arg Leu Ser Cys Pro Arg Met Gly Ser
245 250 255
Phe Leu Thr Leu Gln Ala His Thr Leu His Leu Ser Arg Asp Leu Ala
260 265 270
Thr Ser Pro Arg Thr Ser Asn Arg Gly His Lys Val Glu Val Ser Trp
275 280 285
Glu Gln Arg Ala Ala Gly Met Gly Gly Ala Gly Leu
290 295 300

<210> 3
 <211> 945
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (945)
 <223>

<400> 3
 atg gag gcc aga gct cag agt ggc aac ggg tcg cag ccc ttg ctg cag 48
 Met Glu Ala Arg Ala Gln Ser Gly Asn Gly Ser Gln Pro Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 acg ccc cgt gac ggt ggc aga cag cgt ggg gag ccc gac ccc aga gac 96
 Thr Pro Arg Asp Gly Gly Arg Gln Arg Gly Glu Pro Asp Pro Arg Asp
 20 25 30
 gcc ctc acc cag cag gta cat gtc ttg tct ctg gat cag atc aga gcc 144
 Ala Leu Thr Gln Gln Val His Val Leu Ser Leu Asp Gln Ile Arg Ala
 35 40 45
 atc cga aac acc aat gag tac aca gag ggg cct act gtc gtc cca aga 192
 Ile Arg Asn Thr Asn Glu Tyr Thr Glu Gly Pro Thr Val Val Pro Arg
 50 55 60
 cct ggg ctc aag cct gct cct cgc ccc tcc act cag cac aaa cac gag 240
 Pro Gly Leu Lys Pro Ala Pro Arg Pro Ser Thr Gln His Lys His Glu
 65 70 75 80
 aga ctc cac ggt ctg cct gag cac cgc cag cct cct agg ctc cag cac 288
 Arg Leu His Gly Leu Pro Glu His Arg Gln Pro Pro Arg Leu Gln His
 85 90 95
 tcg cag gtc cat tct tct gca cga gcc cct ctg tcc aga tcc ata agc 336
 Ser Gln Val His Ser Ser Ala Arg Ala Pro Leu Ser Arg Ser Ile Ser
 100 105 110
 acg gtc agc tca ggg tcg cgg agc agt acg agg aca agt acc agc agc 384
 Thr Val Ser Ser Gly Ser Arg Ser Ser Thr Arg Thr Ser Thr Ser Ser
 115 120 125

agc tcc tct gaa cag aga ctg cta gga tca tcc ttc tcc tcc ggg cct 432
 Ser Ser Ser Glu Gln Arg Leu Leu Gly Ser Ser Phe Ser Ser Gly Pro
 130 135 140

gtt gct gat ggc ata atc cgg gtg caa ccc aaa tct gag ctc aag cca 480
 Val Ala Asp Gly Ile Ile Arg Val Gln Pro Lys Ser Glu Leu Lys Pro
 145 150 155 160

ggt gag ctt aag cca ctg agc aag gaa gat ttg ggc ctg cac gcc tac 528
 Gly Glu Leu Lys Pro Leu Ser Lys Glu Asp Leu Gly Leu His Ala Tyr
 165 170 175

agg tgt gag gac tgt ggc aag tgc aaa tgt aag gag tgc acc tac cca 576
 Arg Cys Glu Asp Cys Gly Lys Cys Lys Cys Lys Glu Cys Thr Tyr Pro
 180 185 190

agg cct ctg cca tca gac tgg atc tgc gac aag cag tgc ctt tgc tcg 624
 Arg Pro Leu Pro Ser Asp Trp Ile Cys Asp Lys Gln Cys Leu Cys Ser
 195 200 205

gcc cag aac gtg att gac tat ggg act tgt gta tgc tgt gtg aaa ggt 672
 Ala Gln Asn Val Ile Asp Tyr Gly Thr Cys Val Cys Cys Val Lys Gly
 210 215 220

ctc ttc tat cac tgt tct aat gat gat gag gac aac tgt gct gac aac 720
 Leu Phe Tyr His Cys Ser Asn Asp Asp Glu Asp Asn Cys Ala Asp Asn
 225 230 235 240

cca tgt tct tgc agc cag tct cac tgt tgt aca cga tgg tca gcc atg 768
 Pro Cys Ser Cys Ser Gln Ser His Cys Cys Thr Arg Trp Ser Ala Met
 245 250 255

ggt gtc atg tcc ctc ttt ttg cct tgt tta tgg tgt tac ctt cca gcc 816
 Gly Val Met Ser Leu Phe Leu Pro Cys Leu Trp Cys Tyr Leu Pro Ala
 260 265 270

aag ggt tgc ctt aaa ttg tgc cag ggg tgt tat gac cgg gtt aac agg 864
 Lys Gly Cys Leu Lys Leu Cys Gln Gly Cys Tyr Asp Arg Val Asn Arg
 275 280 285

cct ggt tgc cgc tgt aaa aac tca aac aca gtt tgc tgc aaa gtt ccc 912

Pro Gly Cys Arg Cys Lys Asn Ser Asn Thr Val Cys Cys Lys Val Pro
 290 295 300

act gtc ccc cct agg aac ttt gaa aaa cca aca 945
 Thr Val Pro Pro Arg Asn Phe Glu Lys Pro Thr
 305 310 315

<210> 4
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Ala Arg Ala Gln Ser Gly Asn Gly Ser Gln Pro Leu Leu Gln
 1 5 10 15

Thr Pro Arg Asp Gly Gly Arg Gln Arg Gly Glu Pro Asp Pro Arg Asp
 20 25 30

Ala Leu Thr Gln Gln Val His Val Leu Ser Leu Asp Gln Ile Arg Ala
 35 40 45

Ile Arg Asn Thr Asn Glu Tyr Thr Glu Gly Pro Thr Val Val Pro Arg
 50 55 60

Pro Gly Leu Lys Pro Ala Pro Arg Pro Ser Thr Gln His Lys His Glu
 65 70 75 80

Arg Leu His Gly Leu Pro Glu His Arg Gln Pro Pro Arg Leu Gln His
 85 90 95

Ser Gln Val His Ser Ser Ala Arg Ala Pro Leu Ser Arg Ser Ile Ser
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Ser Arg Ser Ser Thr Arg Thr Ser Thr Ser Ser
 115 120 125

Ser Ser Ser Glu Gln Arg Leu Leu Gly Ser Ser Phe Ser Ser Gly Pro
 130 135 140

Val Ala Asp Gly Ile Ile Arg Val Gln Pro Lys Ser Glu Leu Lys Pro
 145 150 155 160
 Gly Glu Leu Lys Pro Leu Ser Lys Glu Asp Leu Gly Leu His Ala Tyr
 165 170 175
 Arg Cys Glu Asp Cys Gly Lys Cys Lys Cys Lys Glu Cys Thr Tyr Pro
 180 185 190
 Arg Pro Leu Pro Ser Asp Trp Ile Cys Asp Lys Gln Cys Leu Cys Ser
 195 200 205
 Ala Gln Asn Val Ile Asp Tyr Gly Thr Cys Val Cys Cys Val Lys Gly
 210 215 220
 Leu Phe Tyr His Cys Ser Asn Asp Asp Glu Asp Asn Cys Ala Asp Asn
 225 230 235 240
 Pro Cys Ser Cys Ser Gln Ser His Cys Cys Thr Arg Trp Ser Ala Met
 245 250 255
 Gly Val Met Ser Leu Phe Leu Pro Cys Leu Trp Cys Tyr Leu Pro Ala
 260 265 270
 Lys Gly Cys Leu Lys Leu Cys Gln Gly Cys Tyr Asp Arg Val Asn Arg
 275 280 285
 Pro Gly Cys Arg Cys Lys Asn Ser Asn Thr Val Cys Cys Lys Val Pro
 290 295 300
 Thr Val Pro Pro Arg Asn Phe Glu Lys Pro Thr
 305 310 315

<210> 5
 <211> 1230
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1230)

<223>

<400> 5

atg acc gaa gaa aca cac ccg gac gat gac agc tat att gtg cgt gtc 48
Met Thr Glu Glu Thr His Pro Asp Asp Asp Ser Tyr Ile Val Arg Val
1 5 10 15

aag gct gtg gtt atg acc aga gat gac tcc agc ggg gga tgg ttc cca . 96
Lys Ala Val Val Met Thr Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Trp Phe Pro
20 25 30

cag gaa gga ggc ggg atc agt cgc gtc ggc gtg tgt aag gtc atg cac 144
Gln Glu Gly Gly Gly Ile Ser Arg Val Gly Val Cys Lys Val Met His
35 40 45

cct gaa ggc aac gga cga agc ggc ttt ctc atc cat ggc gag cga cag 192
Pro Glu Gly Asn Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ile His Gly Glu Arg Gln
50 55 60

aaa gac aaa ctg gtg gta ttg gaa tgc tat gtc aga aag gac ttg gtc 240
Lys Asp Lys Leu Val Val Leu Glu Cys Tyr Val Arg Lys Asp Leu Val
65 70 75 80

tac acc aaa gcc aat ccg acg ttt cat cat tgg aag gtt gat aac agg 288
 Tyr Thr Lys Ala Asn Pro Thr Phe His His Trp Lys Val Asp Asn Arg
 85 90 95

aag ttt gga ctt act ttc caa agt cct gca gat gca cga gcc ttt gac 336
Lys Phe Gly Leu Thr Phe Gln Ser Pro Ala Asp Ala Arg Ala Phe Asp
100 105 110

agg ggc gtg aga aaa gcc att gaa gac ctt ata gaa ggt tca acg acc 384
Arg Gly Val Arg Lys Ala Ile Glu Asp Leu Ile Glu Gly Ser Thr Thr
115 120 125

tcc tct tcc act ctc cat aac gaa gct gag ctc gga gac gat gac gtt 432
Ser Ser Ser Thr Leu His Asn Glu Ala Glu Leu Gly Asp Asp Asp Val
130 135 140

ttc acg aca gct acg gac agt tct tct aat tcc tcg cag aag agg gag 480
Phe Thr Thr Ala Thr Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ser Gln Lys Arg Glu
145 150 155 160

ccg act acg agg aca atc tcc tcc ccc acg tcc tgt gag cac cgg aag Pro Thr Thr Arg Thr Ile Ser Ser Pro Thr Ser Cys Glu His Arg Lys	528
165 170 175	
att tat acc ctt gac cca tac ccc atg gac cat tac cac cct gac cag Ile Tyr Thr Leu Asp Pro Tyr Pro Met Asp His Tyr His Pro Asp Gln	576
180 185 190	
cgg ttg cgg cgg tcc tac ccc cag gtc acc ttc cca gaa gat gat gaa Arg Leu Pro Arg Ser Tyr Pro Gln Val Thr Phe Pro Glu Asp Asp Glu	624
195 200 205	
gaa att gta cgc atc aac ccc cga gag aag atc tgg atg acc ggt tat Glu Ile Val Arg Ile Asn Pro Arg Glu Lys Ile Trp Met Thr Gly Tyr	672
210 215 220	
gaa gac tac cgg cac gcg ccg gtt cgc ggc aaa tac tta gac acc aca Glu Asp Tyr Arg His Ala Pro Val Arg Gly Lys Tyr Leu Asp Thr Thr	720
225 230 235 240	
gaa gac gcg gac tcc tac gtg cgc ttc gcc aag ggc gaa gtc ccc aaa Glu Asp Ala Asp Ser Tyr Val Arg Phe Ala Lys Gly Glu Val Pro Lys	768
245 250 255	
cac gaa tat acc tat ccc tat gtt gat tct tcg gac ttc ggc ttc ggg His Glu Tyr Thr Tyr Pro Tyr Val Asp Ser Ser Asp Phe Gly Phe Gly	816
260 265 270	
gag gat ccc aaa ggt agt gtg atc aag aca cag ccg ccc agg gcc aag Glu Asp Pro Lys Gly Ser Val Ile Lys Thr Gln Pro Pro Arg Ala Lys	864
275 280 285	
tcc cgt cgg cgg aag gag aac ggc gaa cgg tcg cgg tgt gtg tac tgc Ser Arg Arg Arg Lys Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Cys Val Tyr Cys	912
290 295 300	
agg gat atg ttt aat cac gaa gag aac cga agg ggc cac tgc caa gac Arg Asp Met Phe Asn His Glu Glu Asn Arg Arg Gly His Cys Gln Asp	960
305 310 315 320	
gcg ccc gac gcc gtg aga act tgc att cgc cgg gtg agc tgt atg tgg	1008

Lys Asp Lys Leu Val Val Leu Glu Cys Tyr Val Arg Lys Asp Leu Val
 65 70 75 80

Tyr Thr Lys Ala Asn Pro Thr Phe His His Trp Lys Val Asp Asn Arg
 85 90 95

Lys Phe Gly Leu Thr Phe Gln Ser Pro Ala Asp Ala Arg Ala Phe Asp
 100 105 110

Arg Gly Val Arg Lys Ala Ile Glu Asp Leu Ile Glu Gly Ser Thr Thr
 115 120 125

Ser Ser Ser Thr Leu His Asn Glu Ala Glu Leu Gly Asp Asp Asp Val
 130 135 140

Phe Thr Thr Ala Thr Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ser Gln Lys Arg Glu
 145 150 155 160

Pro Thr Thr Arg Thr Ile Ser Ser Pro Thr Ser Cys Glu His Arg Lys
 165 170 175

Ile Tyr Thr Leu Asp Pro Tyr Pro Met Asp His Tyr His Pro Asp Gln
 180 185 190

Arg Leu Pro Arg Ser Tyr Pro Gln Val Thr Phe Pro Glu Asp Asp Glu
 195 200 205

Glu Ile Val Arg Ile Asn Pro Arg Glu Lys Ile Trp Met Thr Gly Tyr
 210 215 220

Glu Asp Tyr Arg His Ala Pro Val Arg Gly Lys Tyr Leu Asp Thr Thr
 225 230 235 240

Glu Asp Ala Asp Ser Tyr Val Arg Phe Ala Lys Gly Glu Val Pro Lys
 245 250 255

His Glu Tyr Thr Tyr Pro Tyr Val Asp Ser Ser Asp Phe Gly Phe Gly
 260 265 270

Glu Asp Pro Lys Gly Ser Val Ile Lys Thr Gln Pro Pro Arg Ala Lys
 275 280 285

Ser Arg Arg Arg Lys Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Cys Val Tyr Cys
290 295 300

Arg Asp Met Phe Asn His Glu Glu Asn Arg Arg Gly His Cys Gln Asp
305 310 315 320

Ala Pro Asp Ala Val Arg Thr Cys Ile Arg Arg Val Ser Cys Met Trp
325 330 335

Cys Ala Asp Ser Met Leu Tyr His Cys Met Ser Asp Pro Glu Gly Asp
340 345 350

Tyr Thr Asp Pro Cys Ser Cys Asp Thr Ser Asp Glu Lys Phe Cys Leu
355 360 365

Arg Trp Met Ala Leu Ile Ala Leu Ser Phe Leu Ala Pro Cys Met Cys
370 375 380

Cys Tyr Leu Pro Leu Arg Ala Cys His Arg Cys Gly Val Met Cys Arg
385 390 395 400

Cys Cys Gly Gly Lys His Lys Ala Ala Ala
405 410

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002887

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, 31/7088, 35/76, 48/00, A61P19/02, 19/08, 19/10, 29/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/17, 31/7088, 35/76, 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-500623 A (The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University), 08 January, 2002 (08.01.02), Full text; particularly, Claims; page 25, line 3 to page 28, line 24 & WO 98/20032 A1 & EP 960123 A1 & US 6060275 A	6-10
X Y	JP 2000-229883 A (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 22 August, 2000 (22.08.00), Full text (Family: none)	6-8, 10 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 June, 2004 (01.06.04)Date of mailing of the international search report
06 July, 2004 (06.07.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002887

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	YAMASHITA, Akihisa et al., Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats., Journal of Immunology, 2002, Vol.168, No.1, pages 450 to 457	6-8, 10 9
Y	JP 07-265079 A (Yeda Research & Development Co., Ltd.), 17 October, 1995 (17.10.95), Full text; particularly, table 1; Figs. 10, 11 & EP 545343 A1 & AU 9229607 A & CA 2083778 A & ZA 9209100 A	9
Y	YUSOFF Permeen et al., Sprouty 2 Inhibits the Ras/MAP Kinase Pathway by Inhibiting the Activation of Raf, J. Biol.Chem., (2002), Vol.277, No.5, pages 3195 to 3201	9
Y	JP 2003-503313 A (AU Jessie L.-S.), 28 January, 2003 (28.01.03), Full text; particularly, Par. No. [0035] & WO 2000/74634 A2 & EP 1206234 A2 & US 6599912 B1 & KR 2002019924 A	9
Y	WAKIOKA Toru et al., Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling, Nature, (2001), Vol.412, No.9, pages 647 to 651	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002887

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-5

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1 to 5 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002887

<Subject of search>

Claims 6 to 8 and 10 relate to compositions for treating an inflammatory disease associated with bone destruction such as rheumatoid arthritis containing, as the active ingredient, a vector encoding a protein or a nucleic acid defined by a desired property "inhibiting the signal transduction mediated by fibroblast growth factor 2 (FGF2)-FGF receptor 1-Ras-Raf-MAP kinase". It is recognized that only small part of the proteins or nucleic acids having the above property are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the proteins or nucleic acids serving as "a protein or a nucleic acid inhibiting the signal transduction mediated by fibroblast growth factor 2 (FGF2)-FGF receptor 1-Ras-Raf-MAP kinase" cannot be specified.

Such being the case, the search was made exclusively on the relationship between the effect of inhibiting the signal transduction mediated by fibroblast growth factor 2 (FGF2)-FGF receptor 1-Ras-Raf-MAP kinase and an inflammatory diseases associated with bone destruction and a composition for treating an inflammatory disease associated with bone destruction which contains as the active ingredient a vector encoding the protein specified in claim 9.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 31/7088, 35/76, 48/00, A61P19/02, 19/08, 19/10, 29/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 31/7088, 35/76, 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-500623 A (ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ リーランド スタンフォード ジュニア ユニヴァーシティー) 2002.01.08 全文、特に特許請求の範囲、第25頁第3行~第28頁第24行参 照 &WO 98/20032 A1 &EP 960123 A1 &US 6060275 A	6-10
X Y	JP 2000-229883 A (財団法人化学及血清療法研究所) 2000.08.22 全文参照 (ファミリーなし)	6-8, 10 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.06.2004

国際調査報告の発送日

06.7.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

4 P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	YAMASHITA, Akihisa et al., Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats, Journal of Immunology, 2002, Vol.168, No.1, p.450-457	6-8, 10 9
Y	JP 07-265079 A (イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド) 1995.10.17 全文、特に表1、図10及び11参照 &EP 545343 A1 &AU 9229607 A &CA 2083778 A &ZA 9209100 A	9
Y	YUSOFF Permeen et al., Sprouty2 Inhibits the Ras/MAP Kinase Pathway by Inhibiting the Activation of Raf, J. Biol. Chem., (2002), Vol. 277, No. 5, p. 3195-3201	9
Y	JP 2003-503313 A (オウ ジェシー エル エス) 2003.01.28 全文、特に【0035】参照 &WO 2000/74634 A2 &EP 1206234 A2 &US 6599912 B1 &KR 2002019924 A	9
Y	WAKIOKA Toru et al., Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling, Nature, (2001), Vol.412, No.9, p.647-651	9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲1-5は手術又は治療による人体の処置方法に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲6～8及び10は、「繊維芽細胞増殖因子-2 (FGF2)-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する」という所望の性質により定義された蛋白質または核酸をコードするベクターを有効成分とする、関節リウマチ等の骨破壊を伴う炎症性疾患の治療組成物に関するものである。そして、上記性質を有する蛋白質または核酸のうち、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、特定のわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸」は、出願時の技術常識を勘案しても、そのような性質を有する蛋白質または核酸の範囲を特定することができない。

よって、調査は、FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害作用と骨破壊を伴う炎症性疾患との関係について、および請求の範囲9に特定されている蛋白質コードするベクターを有効成分とする骨破壊を伴う炎症性疾患の治療組成物について行った。